

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. August 2001 (16.08.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/58477 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 39/00,
A61P 35/00

(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Trud-
eringer Strasse 246, 81825 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/00470

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:
7. Februar 2001 (07.02.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(30) Angaben zur Priorität:
100 06 033.1 10. Februar 2000 (10.02.2000) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: VON KNEBEL DOEBERITZ, Magnus
[DE/DE]; Chirurgische Universitätsklinik, Sektion für
Molekulare Diagnostik und Therapie, Im Neuenheimer
Feld 110, 69120 Heidelberg (DE).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): LINNEBACHER,
Michael [DE/DE]; zum Klopp 23, 66578 Stennweiler
(DE). RUDY, Wolfgang [DE/DE]; Albert-Einstein-Strasse
76, 75015 Bretten (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: IMMUNIZATION OF AN INDIVIDUAL AGAINST CARCINOMA AND THE PRELIMINARY STAGES THEREOF

(54) Bezeichnung: IMMUNISIERUNG EINES INDIVIDUUMS GEGEN CARCINOME UND IHRE VORSTUFEN

(57) Abstract: The invention concerns a pharmaceutical preparation comprising a cell cycle regulatory protein and/or an expressible nucleic acid which codes for said protein in an amount suitable for immunization of an individual against carcinoma and the preliminary stages thereof, in addition to conventional auxiliary agents. The invention also concerns the use of a cell cycle regulatory protein and/or an expressible nucleic acid which codes for said protein for the immunization of an individual against carcinoma and the preliminary stages thereof.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein Zellzyklus-Regulatorprotein und/oder eine exprimierbare, hierfür kodierende Nukleinsäure in einer für eine Immunisierung eines Individuums gegen Carcinome und ihre Vorstufen geeigneten Menge sowie übliche Hilfsstoffe, und die Verwendung eines Zellzyklus-Regulatorproteins und/oder einer exprimierbaren hierfür kodierenden Nukleinsäure zur Immunisierung eines Individuums gegen Carcinome und ihre Vorstufen.



WO 01/58477 A2

**Immunisierung eines Individuums gegen
Carcinome und ihre Vorstufen**

5 Die vorliegende Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung, die ein Zellzyklus-Regulatorprotein enthält, und die Verwendung der pharmazeutischen Zusammensetzung zur Immunisierung eines Individuums gegen Carcinome und ihre Vorstufen.

10

An Carcinomen erkranken und versterben jährlich mehrere Millionen Menschen weltweit. Diese Sterblichkeitsraten sind seit vielen Jahren unverändert trotz intensiver Therapie-Forschungen. Bisher werden die Patienten mit Carcinomen vielfach einer chirurgischen Entfernung der Carcinome bzw. einer Chemo- oder Strahlentherapie unterzogen. Damit sind aber massivste Nebenwirkungen verbunden, die dann zu den Sterblichkeitsraten der Patienten mit Carcinomen beitragen.

15

20 Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem gegen Carcinome therapeutisch und prophylaktisch vorgegangen werden kann, wobei vorstehende Nebenwirkungen vermieden werden.

25 Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß bei Carcinomen bzw. ihren Vorstufen Zellzyklus-Regulatorproteine in veränderter Form oder Menge vorliegen. Beispielsweise findet sich in Carcinomen eine Überexpression von Zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (vgl. deutsches Pa-

30

tent 198 29 473 des Anmelders). Ferner hat der Anmelder erkannt, daß Individuen gegen in Form oder Menge veränderte Zellzyklus-Regulatorproteine immunisiert werden können, wodurch gegen Carcinome und ihre Vorstufen therapeutisch und prophylaktisch vorgegangen werden kann. Der Anmelder hat dies in invitro- wie auch in invivo-Experimenten gezeigt (vgl. nachstehendes Beispiel).

Somit betrifft die vorliegende Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein Zellzyklus-Regulatorprotein und/oder eine exprimierbare hierfür kodierende Nukleinsäure in einer für eine Immunisierung eines Individuums gegen Carcinome und ihre Vorstufen geeigneten Menge sowie übliche Hilfsstoffe.

Der verwendete Ausdruck "Zellzyklus-Regulatorprotein" umfaßt Zellzyklus Regulatorproteine jeglicher Art und Herkunft. Beispielsweise können es Zykline sein. Besonders können es Zyklin-abhängige Kinasen, wie cdk4 und cdk6, sein, welche die Zykline regulieren. Ganz besonders können es Zyklin-abhängige Kinase-Inhibitoren sein, welche wiederum die Zyklin-abhängigen Kinasen regulieren. Beispiele der Zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitoren sind die Proteine p15, p16, p18, p19, wobei p16 bevorzugt ist. Die Zellzyklus-Regulatorproteine können in Wildtyp- oder veränderter Form vorliegen. Letztere Form umfaßt Veränderungen der Aminosäuresequenz, wie Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen von einer oder mehreren Aminosäuren. Auch können Fragmente von Zellzyklus-Regulatorproteinen als solche oder in Verbindung mit Trägern vorliegen, wobei die Fragmente eine Wildtyp- oder eine veränderte Aminosäuresequenz haben können. Günstig ist es, wenn die Träger im Individuum nicht als immunogen wirken. Solche Träger können Individuum-eigene oder -fremde Proteine bzw. Fragmente davon sein. Bevorzugt sind Träger, wie Serumalbumin, Fibrinogen oder Transferrin bzw. ein Fragment davon. Besonders günstig ist es, wenn die Fragmente der Zellzyklus-Regulatorproteine Epitope enthalten, die von cytotoxischen T-Zellen, z.B. CD8⁺ T-Zellen, erkannt werden und eine cytotoxische Immunantwort induzieren können. Solche Epitope von Zellzyklus-Regu-

lаторproteinen können durch dem Fachmann bekannte Verfahren, insbesondere durch Verwendung eines Softwaresystems des NIH (NIH bioinformation service http://bimas.dcr:.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform) ermittelt werden. Von Vorteil kann es ferner sein, wenn unterschiedliche Zellzyklus-Regulatorproteine oder Fragmente davon, für die vorstehenden Ausführungen entsprechend gelten, gleichzeitig vorliegen. Zur Herstellung vorstehender Zellzyklus-Regulatorproteine wird z.B. auf Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY (1989) verwiesen.

Der verwendete Ausdruck "exprimierbare für ein Zellzyklus-Regulatorprotein kodierende Nukleinsäure" umfaßt jegliche Nukleinsäure, z.B. RNA oder DNA, die in einem Individuum exprimierbar ist und für ein Zellzyklus-Regulatorprotein, für das vorstehende Ausführungen entsprechend gelten, kodiert. Die Nukleinsäure kann als solche, d.h. zusammen mit für ihre Expression geeigneten Elementen, oder in Verbindung mit einem Vektor vorliegen. Beispiele solcher Elemente sind Promotoren und Enhancer, wie CMV-, SV40-, RSV-, Metallothionein I und Polyhedrin-Promotor bzw. CMV- und SV40-Enhancer. Weitere für die Expression geeignete Sequenzen gehen aus Goeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) hervor. Darüberhinaus können als Vektoren jegliche für die Expression in Säugerzellen geeignete Vektoren verwendet werden. Dies sind z.B. pcDNA3, pMSX, pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4 sowie von pcDNAI/amp, pcDNAI/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo und pHyg stammende Vektoren. Auch können als Vektoren rekombinante Viren, z.B. Adenovirus, Vaccinia-Virus oder Adeno-assoziiertes Virus, verwendet werden. Hinsichtlich der Herstellung vorstehender Nukleinsäuren, insbesondere von Vektoren, die solche Nukleinsäuren enthalten, wird z.B. auf Sambrook et al., supra, verwiesen.

Der verwendete Ausdruck "Carcinome und ihre Vorstufen" umfaßt Carcinome jeglicher Art und Herkunft bzw. Vorstufen dieser.

Beispielsweise können es Carcinome des oberen Respirationstraktes oder Anogenital-Carcinome, insbesondere das Cervix-Carcinom und seine Vorstufen, wie cervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN I-III), Carcinoma in situ (CIS), etc. sein. Ebenso sind auch benigne Veränderungen wie Papillome, Adenome, Hyperplasien oder ähnliche Proliferationen epithelialer, mesenchymaler oder hämatopoetischer Proliferationen hier zuzuordnen.

Der verwendete Ausdruck "Individuum" umfaßt ein Individuum jeglicher Art und Herkunft, das Zellzyklus-Regulatorproteine aufweist und an Carcinomen bzw. ihren Vorstufen erkranken kann. Beispiele eines solchen Individuums sind der Mensch und das Tier sowie Zellen von diesen.

Der verwendete Ausdruck "für eine Immunisierung eines Individuums geeignete Menge" umfaßt jegliche Menge eines Zellzyklus-Regulatorproteins, für das vorstehende Ausführungen entsprechend gelten, bzw. einer exprimierbaren hierfür kodierenden Nukleinsäure, für die vorstehende Ausführungen entsprechend gelten, mit der ein Individuum immunisiert werden kann. Die Menge hängt davon ab, ob ein Zellzyklus-Regulatorprotein oder eine exprimierbare hierfür kodierende Nukleinsäure verwendet wird. Auch hängt die Menge davon ab, ob die Immunisierung des Individuums mehr auf eine Induktion von gegen veränderte Zellzyklus-Regulatorproteine gerichteten Antikörpern oder auf eine Stimulierung von gegen veränderte Zellzyklus-Regulatorproteine gerichteten cytotoxischen T-Zellen, z.B. CD8⁺ T-Zellen, abzielt. Beide Möglichkeiten der Immunisierung können durch die vorliegende Erfindung erreicht werden. Desweiteren hängt die Menge davon ab, ob die Immunisierung als prophylaktische oder therapeutische Behandlung beabsichtigt ist. Darüber hinaus spricht das Alter, das Geschlecht und das Gewicht des Individuums eine Rolle für die Bestimmung der Menge. Günstig ist es, wenn dem Individuum 100µg - 1 g eines Zellzyklus-Regulatorproteins bzw. 10⁶ - 10¹² MOI eines rekombinanten, eine exprimierbare für ein Zellzyklus-Regulatorprotein kodierende Nukleinsäure

enthaltenden Virus injiziert werden. Die Injektion kann an mehreren Stellen des Individuums intramuskulär, subkutan, intradermal oder in jeder anderen Applikationsform erfolgen. Ferner kann es günstig sein, ein oder mehrere "Booster-Injektionen" mit ca. gleicher Menge durchzuführen, wobei es besonders günstig sein kann, in den einzelnen Injektionen verschiedene Fragmente der jeweiligen Zellzyklus-Regulatorproteine zu verwenden.

Der verwendete Ausdruck "übliche Hilfsstoffe" umfaßt jegliche Hilfsstoffe, die sich für eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Immunisierung eines Individuums eignen. Solche Hilfsstoffe sind z.B. Immunisierungs-Adjuvantien, wie GM-CSF oder Freund's Adjuvans, gepufferte Kochsalzlösungen, Wasser, Emulsionen, wie Öl/Wasser-Emulsionen, Netzmittel, sterile Lösungen, etc.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, Individuen, insbesondere den Menschen und Tiere, gegen veränderte Zellzyklus-Regulatorproteine zu immunisieren. Die Immunisierung erfolgt sowohl durch die Induktion von Antikörpern als auch durch die Stimulierung von CD8⁺-T Zellen, die gegen veränderte Zellzyklus-Regulatorproteine gerichtet sind. Somit ist ein prophylaktisches und therapeutisches Vorgehen gegen Carcinome und ihre Vorstufen möglich.

Die Erfindung wird durch das nachfolgende Beispiel erläutert.

Beispiel: Stimulierung von CD8⁺-T Zellen gegen den zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitor p16 und Lyse von p16-überexprimierenden Carcinom-Zellen.

(A) Stimulierung von CD8⁺-T Zellen gegen p16.

Von einem gesunden Spender werden periphere mononukleäre Zellen gewonnen und einer sog. ELISPOT-Analyse unterzogen. Das Prinzip dieses Experimentes ist, daß Lymphozyten in Kulturgefäßen mit spezifischen Antigenen stimuliert werden. Kommt es zur Aktivierung der Lymphozyten, da diese das Antigen

erkennen, setzen die aktivierten Lymphozyten Zytokine frei, die ihrerseits an spezifische Antikörper binden, welche auf der Bodenfläche der Kulturgefäße immobilisiert sind. Nach dem Auswaschen der Lymphozyten können dann die gebundenen Zytokine in den Kulturgefäßen mit Hilfe eines zweiten Antikörpers, der in einer nachgeschalteten Farbreaktion sichtbar gemacht wird, nachgewiesen werden.

Periphere Blutlymphozyten (PBL) werden von einem HLA-A0201 positiven gesunden Probanden durch Dichtezentrifugation über einen Ficoll Paque®-Gradienten aufgereinigt. T-Lymphozyten werden durch Abtrennung der B-Lymphozyten bzw. der Monozyten mit Hilfe Antikörper gekoppelter Magnetobeads (CD11, CD16, CD19, CD36 und CD56) (Pant T cell isolation Kit®, Milteny, Bergisch Gladbach, Germany) gewonnen. Aus 30 ml Blut werden etwa 2×10^7 T-Zellen gewonnen werden.

HLA-A0201 restringierte Peptide von p16 werden mittels eines Softwaresystems des NIH (NIH bioinformation service [http://bimas.dcrt.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform]) identifiziert. Es handelt sich um die nachstehenden Peptide:

| 9mer Peptide: | 10mer Peptide: |
|--------------------|---------------------|
| score 1: VMMGSARV | score 1: MMGSARVAEL |
| score 2: VLHRAGARL | score 2: LLLHGAEPNC |
| score 3: TLTRPVHDA | score 3: GVMMGSARV |
| score 4: LLHGAEPNC | |
| score 5: SMEPSADML | |

Die isolierten T-Zellen werden mit T2-Zellen inkubiert, die (a) mit einem Gemisch der vorstehenden 9mer Peptide ($10\mu\text{g}/\text{Peptid}$) und (b) mit einem Gemisch der vorstehenden 10mer Peptide ($10\mu\text{g}/\text{Peptid}$) beladen worden sind. Die T-Zellen werden über 6-Wochen jeweils wöchentlich restimuliert. Jeweils 10^7 T-Zellen werden mit 2×10^6 Peptid-beladenen T2-Zellen in 24 Lochplatten kokultiviert.

Die Reaktivität gegenüber den Peptid-beladenen T2-Zellen wird

wöchentlich bestimmt, beginnend am Tag 0 des Experiments, indem eine IFN- γ Elispotanalyse durchgeführt wird. Am Tag 28 wird eine Reaktivität durch das Gemisch von (a) (400 spezifische Zellen pro Million Zellen) beobachtet. Die Hauptreaktivität ist dabei gegen das Peptid VMMGSARV (1000 spezifische Zellen / 1 000 000 Zellen) gerichtet (Fig. 1). Eine schwächere Aktivität wird gegen das Gemisch von (b) (150 spezifische Zellen / 1 000 000 Zellen) beobachtet. Hier zeigt das Peptid MMGSARVAEL die höchste Reaktivität (600 spezifische Zellen / 1 000 000 Zellen).

Somit wird deutlich, daß gegen p16 aktivierte CD8⁺-T Zellen stimuliert werden können.

(B) Lyse von p16-überexprimierenden Carcinom-Zellen

Nach einer weiteren Restimulierung werden die aktivierten CD8⁺-T Zellen mit den HLA A0201+ Zervixkarzinomzellen Caski, die p16 überexprimieren, inkubiert. Als Kontrollen werden die Kolonkarzinomzellen SW480 verwendet, die p16 nicht überexprimieren. 10⁶ Caski-Zellen werden mit ⁵¹Cr (100 μ Ci) für 1 h bei 37°C markiert und mit steigenden Zahlen an aktivierten CD8⁺-T Zellen für 3 Stunden kokultiviert. Die spezifische Lyse der Caski-Zellen wird durch die Menge der freigesetzten Radioaktivität im Überstand bestimmt.

Es zeigt sich, daß Caski-Zellen durch die aktivierenden CD8⁺-T Zellen, nicht aber die Kontrollzellen SW480 lysiert werden (Fig. 2).

Patentansprüche

5

10

15

20

25

30

35

1. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein Zellzyklus-Regulatorprotein und/oder eine exprimierbare, hierfür kodierende Nukleinsäure in einer für eine Immunisierung eines Individuums gegen Carcinome und ihre Vorstufen geeigneten Menge sowie üblich Hilfsstoffe.
2. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das Zellzyklus-Regulatorprotein ein Zyklin ist.
3. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das Zellzyklus-Regulatorprotein eine Zyklin-abhängige Kinase ist.
4. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 3, wobei die Zyklin-abhängige Kinase cdk4 oder cdk6 ist.
5. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das Zellzyklus-Regulatorprotein ein Zyklin-abhängiger Kinase-Inhibitor ist.
6. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 5, wobei der Zyklin-abhängige Kinase-Inhibitor ein Protein p15, p16, p18 oder p19 ist.
7. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Zellzyklus-Regulatorprotein in Form eines oder mehrerer Fragmente vorliegt.
8. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 7, wobei das oder die Fragmente von cytotoxischen T-Zellen erkennbare und eine cytotoxische Immunantwort auslösende Epitope enthalten.

9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Carcinome solche des oberen Respirationstraktes sind.
- 5 10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Carcinome Anogenital-Carcinome sind.
11. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 10, wobei das Anogenital-Carcinom ein Cervix-Carcinom ist.
- 10 12. Verwendung eines Zellzyklus-Regulatorproteins und/oder einer exprimierbaren hierfür kodierenden Nukleinsäure zur Immunisierung eines Individuums gegen Carcinome und ihre Vorstufen.
- 15 13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei das Zellzyklus-Regulatorprotein ein Zyklin ist.
- 20 14. Verwendung nach Anspruch 12, wobei das Zellzyklus-Regulatorprotein eine Zyklin-abhängige Kinase ist.
15. Verwendung nach Anspruch 14, wobei die Zyklin-abhängige Kinase cdk4 oder cdk6 ist.
- 25 16. Verwendung nach Anspruch 12, wobei das Zellzyklus-Regulatorprotein ein Zyklin-abhängiger Kinase-Inhibitor ist.
- 30 17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei der Zyklin-abhängige Kinase-Inhibitor ein Protein p15, p16, p18 oder p19 ist.
18. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 bis 17, wobei das Zellzyklus-Regulatorprotein in Form eines oder mehrerer Fragmente vorliegt.
- 35 19. Verwendung nach Anspruch 18, wobei das oder die Fragmente von cytotoxischen T-Zellen erkennbare und eine cytotoxische Immunantwort auslösende Epitope enthalten.

20. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 bis 19, wobei die Carcinome solche des oberen Respirationstraktes sind.
21. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 bis 19, wobei die Carcinome Anogenital-Carcinome sind.
22. Verwendung nach Anspruch 21, wobei das Anogenital-Carcinom ein Cervix-Carcinom ist.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. August 2001 (16.08.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/58477 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 39/00, A61P 35/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/00470

(22) Internationales Anmeldedatum:
7. Februar 2001 (07.02.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 06 033.1 10. Februar 2000 (10.02.2000) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: VON KNEBEL DOEBERITZ, Magnus [DE/DE]; Chirurgische Universitätsklinik, Sektion für Molekulare Diagnostik und Therapie, Im Neuenheimer Feld 110, 69120 Heidelberg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LINNEBACHER, Michael [DE/DE]; zum Klopp 23, 66578 Stennweiler (DE). RUDY, Wolfgang [DE/DE]; Albert-Einstein-Strasse 76, 75015 Bretten (DE).

(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, 81825 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 11. April 2002

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: IMMUNIZATION OF AN INDIVIDUAL AGAINST CARCINOMA AND THE PRELIMINARY STAGES THEREOF

(54) Bezeichnung: IMMUNISIERUNG EINES INDIVIDUUMS GEGEN CARCINOME UND IHRE VORSTUFEN

(57) Abstract: The invention concerns a pharmaceutical preparation comprising a cell cycle regulatory protein and/or an expressible nucleic acid which codes for said protein in an amount suitable for immunization of an individual against carcinoma and the preliminary stages thereof, in addition to conventional auxiliary agents. The invention also concerns the use of a cell cycle regulatory protein and/or an expressible nucleic acid which codes for said protein for the immunization of an individual against carcinoma and the preliminary stages thereof.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein Zellzyklus-Regulatorprotein und/oder eine exprimierbare, hierfür kodierende Nukleinsäure in einer für eine Immunisierung eines Individuums gegen Carcinome und ihre Vorstufen geeigneten Menge sowie übliche Hilfsstoffe, und die Verwendung eines Zellzyklus-Regulatorproteins und/oder einer exprimierbaren hierfür kodierenden Nukleinsäure zur Immunisierung eines Individuums gegen Carcinome und ihre Vorstufen.

WO 01/58477 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 01/00470

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K39/00 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, SCISEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X | <p>CARTER, J. H. (1) ET AL: "Cyclin - an overexpressed cell cycle protein as a potential tumour antigen target for immunotherapy." IMMUNOLOGY, (DEC., 1998) VOL. 95, NO. SUPPL. 1, PP. 104. MEETING INFO.: 6TH ANNUAL CONGRESS OF THE BRITISH SOCIETY FOR IMMUNOLOGY HARROGATE, ENGLAND, UK DECEMBER 1-4, 1998 , XP002177603 the whole document</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p> | 1,2,12,13 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"8" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 September 2001

Date of mailing of the international search report

27/09/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stein, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 01/00470

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X | WO 99 02183 A (SIMARD JOHN J L ;CTL IMMUNOTHERAPIES CORP (CA); KUENDIG THOMAS M () 21 January 1999 (1999-01-21) page 6, line 5 - line 18 page 16, line 3 - line 19 page 19, line 10 -page 20, line 18 page 21, line 18 - line 31 page 53, line 11 - line 17 claims 1,4,5,18,19 ---- | 1,3-22 |
| X | WO 98 45444 A (UNIV CALIFORNIA) 15 October 1998 (1998-10-15) page 5, line 7 - line 17 page 5, line 36 -page 7, line 4 table 1 claims 1-7 ---- | 1,3-8, 12,14-19 |
| X | WO 99 19357 A (HARVARD COLLEGE ;MCKEON FRANK (US); YANG ANNIE (US)) 22 April 1999 (1999-04-22) page 88, line 26 -page 96, line 26 ---- | 1,7-9, 12,18-20 |
| A | DE 198 29 473 A (MAGNUS VON KNEBEL DOEBERITZ CH) 13 January 2000 (2000-01-13) cited in the application the whole document ----- | 1-22 |

FURTHER INFORMATION PCT/ISA/210

Continuation of field I.2

Claims nos: 1, 5, 7-12, 16, 18-22 (all in part)

The relevant patent claims nos. 1, 7-12, 18-22 relate to proteins, which are only characterised by their cell-cycle regulatory function, no details being given of structural or basic characteristics. In addition, the relevant patent claims 5 and 16 relate to cyclin-dependent kinase inhibitors, which are however not defined in detail.

The patent claims therefore cover all proteins having said function, of which only a small portion of said proteins are supported by the patent application in the description according to the terms of PCT Article 5. In the present case, the patent claims lack the appropriate support and the patent application lacks the required disclosure to such an extent that a meaningful search encompassing the entire scope of protection sought seems impossible. Aside from this, the patent claims also lack clarity under the terms of PCT Article 6, in attempting to define the protein by the result that is sought in each case. This absence of clarity is such that it makes it impossible to conduct a meaningful and complete search encompassing the entire scope of protection sought. The search therefore focussed on parts of the patent claims that seemed to be clear, supported or disclosed according to the aforementioned terms, namely the parts relating to the proteins given in the description on page 2, lines 16-23, in the example and in the patent claims nos. 2-4, 6, 13-15 and 17. In addition, the general term «cell cycle regulatory protein» was researched.

The applicant is therefore advised that patent claims, or sections of patent claims relating to inventions for which no international search report was drafted, cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). EPO policy, when acting as an International Preliminary Examining Authority, is normally not to carry out a preliminary examination of subject matter, for which no search has been conducted. This is also the case, irrespective of whether the claims are amended following receipt of the international search report (PCT Article 19) or during any PCT Chapter II procedure whereby the applicant submits new patent claims.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 01/00470

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---------------------|---|--|
| WO 9902183 | A | 21-01-1999 | AU 8568998 A EP 1003548 A1 WO 9902183 A2 | 08-02-1999 31-05-2000 21-01-1999 |
| WO 9845444 | A | 15-10-1998 | AU 6966798 A WO 9845444 A1 | 30-10-1998 15-10-1998 |
| WO 9919357 | A | 22-04-1999 | AU 1099699 A WO 9919357 A2 JP 2000078321 A | 03-05-1999 22-04-1999 14-03-2000 |
| DE 19829473 | A | 13-01-2000 | DE 19829473 A1 AU 5848799 A BR 9912227 A CN 1307681 T WO 0001845 A2 EP 1092155 A2 NO 20006681 A | 13-01-2000 24-01-2000 24-04-2001 08-08-2001 13-01-2000 18-04-2001 26-02-2001 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/00470

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K39/00 A61P35/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, SCISEARCH

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X | CARTER, J. H. (1) ET AL: "Cyclin - an overexpressed cell cycle protein as a potential tumour antigen target for immunotherapy." IMMUNOLOGY, (DEC., 1998) VOL. 95, NO. SUPPL. 1, PP. 104. MEETING INFO.: 6TH ANNUAL CONGRESS OF THE BRITISH SOCIETY FOR IMMUNOLOGY HARROGATE, ENGLAND, UK DECEMBER 1-4, 1998 , XP002177603 das ganze Dokument --- -/-- | 1,2,12, 13 |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen.

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

A Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. September 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

27/09/2001

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Befullmächtigter Bediensteter

Stein, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ternationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/00470

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|--|--------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| X | <p>WO 99 02183 A (SIMARD JOHN J L ;CTL IMMUNOTHERAPIES CORP (CA); KUENDIG THOMAS M () 21. Januar 1999 (1999-01-21) Seite 6, Zeile 5 - Zeile 18 Seite 16, Zeile 3 - Zeile 19 Seite 19, Zeile 10 -Seite 20, Zeile 18 Seite 21, Zeile 18 - Zeile 31 Seite 53, Zeile 11 - Zeile 17 Ansprüche 1,4,5,18,19 ----</p> | 1,3-22 |
| X | <p>WO 98 45444 A (UNIV CALIFORNIA) 15. Oktober 1998 (1998-10-15) Seite 5, Zeile 7 - Zeile 17 Seite 5, Zeile 36 -Seite 7, Zeile 4 Tabelle 1 Ansprüche 1-7 ----</p> | 1,3-8, 12,14-19 |
| X | <p>WO 99 19357 A (HARVARD COLLEGE ;MCKEON FRANK (US); YANG ANNIE (US)) 22. April 1999 (1999-04-22) Seite 88, Zeile 26 -Seite 96, Zeile 26 ----</p> | 1,7-9, 12,18-20 |
| A | <p>DE 198 29 473 A (MAGNUS VON KNEBEL DOEBERITZ CH) 13. Januar 2000 (2000-01-13) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----</p> | 1-22 |

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1,5,7-12,16,18-22 (alle teilweise)

Die geltenden Patentansprüche 1,7-12,18-22 beziehen sich auf Proteine die alleine durch ihre Zellzyklus-Regulatorfunktion charakterisiert werden ohne irgendeine Angabe von strukturellen oder essentiellen Charakteristika. Weiterhin beziehen sich die geltenden Patentansprüche 5 und 16 auf Zyklin-abhängige Kinase-Inhibitoren die jedoch nicht weiter charakterisiert sind.

Die Patentansprüche umfassen daher alle Proteine die diese Funktion aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für eine begrenzte Zahl solcher Proteine liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Protein über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend die Proteine erläutert in der Beschreibung auf Seite 2 Zeilen 16-23, im Ausführungsbeispiel und in den Patentansprüchen 2-4,6,13-15 und 17. Zusätzlich wurde der allgemeine Begriff 'Zellzyklus-Regulatorprotein' recherchiert.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/00470

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|---|--|
| WO 9902183 A | 21-01-1999 | AU 8568998 A EP 1003548 A1 WO 9902183 A2 | 08-02-1999 31-05-2000 21-01-1999 |
| WO 9845444 A | 15-10-1998 | AU 6966798 A WO 9845444 A1 | 30-10-1998 15-10-1998 |
| WO 9919357 A | 22-04-1999 | AU 1099699 A WO 9919357 A2 JP 2000078321 A | 03-05-1999 22-04-1999 14-03-2000 |
| DE 19829473 A | 13-01-2000 | DE 19829473 A1 AU 5848799 A BR 9912227 A CN 1307681 T WO 0001845 A2 EP 1092155 A2 NO 20006681 A | 13-01-2000 24-01-2000 24-04-2001 08-08-2001 13-01-2000 18-04-2001 26-02-2001 |